

Beatriz dos Santos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM
GUANOSINA SOBRE O COMPORTAMENTO E A
NEUROGÊNESE DE CAMUNDONGOS ADULTOS**

Trabalho apresentado ao Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Inês
Tasca
Coorientadora: Dr.^a Tetsadê Piermartiri

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Beatriz dos

Avaliação do efeito do tratamento crônico com
guanosina sobre o comportamento e a neurogênese em
camundongos adultos / Beatriz dos Santos ;
orientador, Carla Inês Tasca, coorientador,
Tetsadê Piermartiri, 2017.

72 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Guanosina. 3.
Neurogênese. 4. Efeito antidepressivo. I. Tasca,
Carla Inês . II. Piermartiri, Tetsadê. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. IV. Título.

Beatriz dos Santos

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM
GUANOSINA SOBRE O COMPORTAMENTO E A
NEUROGÊNESE EM CAMUNDONGOS ADULTOS**

Este Trabalho foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel
em Ciências Biológicas e aprovada em sua forma final.

Florianópolis, 26 de maio de 2017.

Prof Dr Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Carla Inês Tasca
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Tetsadê Piermartiri
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Severo Rodrigues
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Patrícia de Souza Brocardo
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Leandra Constantino
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à minha família,
meu marido e a todos que contribuíram de
alguma forma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Lúcia e João, por serem os guias de cada passo que dou e exemplos de seres-humanos, sem eles este trabalho teria sido impossível. À minha irmã Camila e ao meu sobrinho Gabriel, pelo amor e carinho recebido mesmo à distância e especialmente à minha prima Léia, por me trazer para esta cidade e ter me ajudado de todas as formas possíveis.

Ao meu marido, pelo apoio desde o vestibular e nas horas em que as coisas mais básicas eram difíceis. Obrigada por estar ao meu lado fazendo minha vida mais completa.

Aos amigos que fiz durante a graduação: Samara, Matheus, Isabela, Fabiana, Karla e tantos outros que me fizeram rir e estiveram ao meu lado, tornando a graduação mais leve e minha vida mais feliz.

Aos meus amigos e colegas do laboratório Neuroquímica 4, pelas instruções e auxílio, em especial à Luisa e à Flávia.

À minha coorientadora Tet, pela paciência e ensinamentos para a vida acadêmica e pessoal.

À minha orientadora Dr^a Carla Inês Tasca, pela imensa paciência e conhecimento.

À CAPES, pelo apoio financeiro desta pesquisa com bolsa auxílio.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar aquilo que ninguém ainda pensou,
sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A neurogênese é um processo definido como o nascimento de novos neurônios e consiste em uma série de etapas que podem ser examinadas separadamente: a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência celular. As células-tronco neurais foram identificadas em regiões específicas do cérebro humano adulto: na zona subgranular do giro dentado do hipocampo e na zona subventricular dos ventrículos laterais. Nestas regiões, as células-tronco neurais dão origem a células progenitoras neurais tipo 1, que dão origem às células tipo 2, sendo essas células comprometidas com a origem de neurônios ou células da glia. As células progenitoras neurais da zona subventricular migram até o Bulbo Olfatório para suplementar essa região com novos neurônios ou células gliais. A neurogênese pode ser modulada através de meios endógenos e exógenos e dentre esses fatores este estudo irá abordar o papel da guanosina, o qual demonstra exercer efeitos tróficos e mitóticos sobre células neurais *in vitro* e *in vivo*. A guanosina é um nucleosídeo purinérgico endógeno derivado da guanina com importantes efeitos neuroprotetores e neurotróficos descritos em vários estudos. A guanosina tem demonstrado um importante efeito neuroprotetor atuando sobre o sistema glutamatérgico, diminuindo o dano celular decorrente da super-estimulação glutamatérgica e ainda prevenindo alterações comportamentais. Seus efeitos neurotróficos do tratamento *in vivo* dependem da sua ação extracelular nas células neurais, promovendo sinalização e ativação de fatores tróficos. Estudos sugerem que a guanosina extracelular no Sistema Nervoso Central atua estimulando a proliferação, a síntese de fatores tróficos e a diferenciação celular. Com base em todas as evidências de ação da guanosina, este estudo avaliou o efeito neurogênico e tipo-antidepressivo da guanosina e sua influência em testes comportamentais que avaliam a memória em roedores. O presente estudo demonstrou que a administração crônica de guanosina na dose de 8mg/kg por 25 dias via i.p. em camundongos da linhagem C57BL/6 induziu a proliferação celular na zona subventricular e no giro dentado, além de aumento da quantidade de neurônios no giro dentado evidenciando efeito neurogênico nessa região. Também demonstrou efeito tipo-antidepressivo sem alterar o desempenho dos animais em testes que avaliam a memória e o aprendizado. Em trabalhos futuros será investigado se o efeito neurogênico da guanosina é devido ao aumento da síntese e liberação de fatores neurotróficos e fatores de crescimento.

Palavras-chave: neurogênese, guanosina, células progenitoras neurais, tipo-antidepressivo.

ABSTRACT

Neurogenesis it is a process defined as the birth of new neurons and consists in a series of steps that can be examined separately: proliferation, differentiation and cell survival. Neural stem cells were identified in specific regions of adult human brain: the subgranular zone of the hippocampus gyrus and the subventricular zone of the lateral ventricles. In these regions, neural stem cells give rise to type 1 neural progenitor cells, which give rise to type 2 cells, these cells being compromised with the origin of neurons or glial cells. The neural progenitor cells of the subventricular zone migrate to the Olfactory Bulb to supplement this region with new neurons or glial cells. Neurogenesis can be modulated through endogenous and exogenous features. Among these factors this study will address the role of guanosine, which demonstrates trophic and mitotic effects on neural cells *in vitro* and *in vivo*. Guanosine is an endogenous purinergic nucleoside derived from guanine which has been show important neuroprotective and neurotrophic effects described in several studies. Guanosine has demonstrated an important neuroprotective effect acting on the glutamatergic system, reducing cellular damage due to glutamatergic super-stimulation and still preventing behavioral changes. This neurotrophic effects in *in vivo* treatment depend on its extracellular effects on neural cells, promoting signaling and activation of trophic factors. Studies suggest that the extracellular guanosine in the Central Nervous System acts stimulating the cellular proliferation and differentiation, also the synthesis of trophic factors. Based on all evidence of guanosine effects, this study evaluated the neurogenic and antidepressant-like effect of guanosine and its influence on behavioral tests that evaluated memory in rodents. The present study demonstrated that chronic administration of guanosine at 8mg / kg for 25 days via i.p in mice (C57BL/6) induced cell proliferation in the subventricular zone and in the dentate gyrus, also an increase in the number of neurons in the dentate gyrus evidencing neurogenic effect in this region. Additionally, Guanosine demonstrated antidepressant-like effect without altering the performance of animals in tests that evaluate memory and learning. Future work will investigated if the neurogenic effect of guanosine is due to increased synthesis and release of neurotrophic factors and growth factors.

Keywords: neurogenesis, guanosine, neural stem cells, antidepressant-like.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema demonstrando as etapas da neurogênese.....	19
Figura 2: Esquema com desenho experimental geral.....	36
Figura 3. Efeito do tratamento com guanosina no teste de campo aberto.....	42
Figura 4: Efeito do tratamento com guanosina no teste de realocação de objetos.....	43
Figura 5. Demonstração do desempenho de camundongos após tratamento com guanosina no teste do labirinto em Y.....	45
Figura 6. Efeito do tratamento com guanosina na redução do tempo de imobilidade observado no teste de suspensão pela cauda.....	46
Figura 7: Esquema demonstrando as áreas cerebrais neurogênicas em corte coronal.....	47
Figura 8. Efeito neurogênico da guanosina na zona subventricular.....	48
Figura 9. Efeito neurogênico da guanosina no giro denteado.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc - 5'-monofosfato de adenosina cíclico
BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BrdU - 5'-bromo-2'-desoxiuridina
CA - campo aberto
DG - giro denteado
FGF-2 - Fator de crescimento de fibroblasto-2
GFAP - Proteína ácida fibrilar glial
GMP - 5'-monofosfato de guanosina
GMPc - 5'-monofosfato de guanosina cíclico
GUO - guanosina
HB-EGF - do inglês: *heparin binding epidermal growth factor-like growth factor*
i.p. - intra-peritoneal
MAPKs - proteínas cinases ativadas por mitógenos
MPP+ - 1-metil-4-fenilpiridínio
mTOR - proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NGF - fator de crescimento do nervo
NMDA - N-metil-D-aspartato
PBS - tampão de fosfato salina
PBS-T - tampão de fosfato salina com tween
PI3K/Akt - fosfatidilinositol 3'-cinase/Akt
RO - Realocação de objeto
SC - suspensão pela cauda
SGZ - zona subgranular
SVZ - zona subventricular
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Neurogênese.....	17
1.1.1 Fatores que modulam a neurogênese.....	22
1.2 Guanosina.....	25
1.2.1 Efeito neuroprotetor da guanosina.....	26
1.2.2 Efeito neurotrófico da guanosina.....	29
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Animais.....	35
4.2 Desenho experimental.....	35
4.3 Administração de guanosina.....	36
4.4 Administração de bromodeoxiuridina.....	36
4.5 Avaliação comportamental.....	37
4.5.1 Campo aberto.....	37
4.5.2 Realocação de objetos.....	38
4.5.3 Labirinto em Y.....	38
4.5.4 Teste de suspensão pela cauda.....	39
4.6 Imunoistoquímica.....	39
4.7 Análises estatísticas.....	41
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Testes comportamentais.....	41

5.2 Efeito do tratamento com a guanosina na neurogênese.....	47
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÃO.....	57
PERSPECTIVAS.....	57
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neurogênese

A neurogênese é um processo definido como o nascimento de novos neurônios e consiste em uma série de etapas que podem ser examinadas separadamente: a proliferação, a diferenciação, a migração e a sobrevivência celular (AIMONE et al., 2014; KEMPERMANN et al., 1998; SINGH et al., 2016).

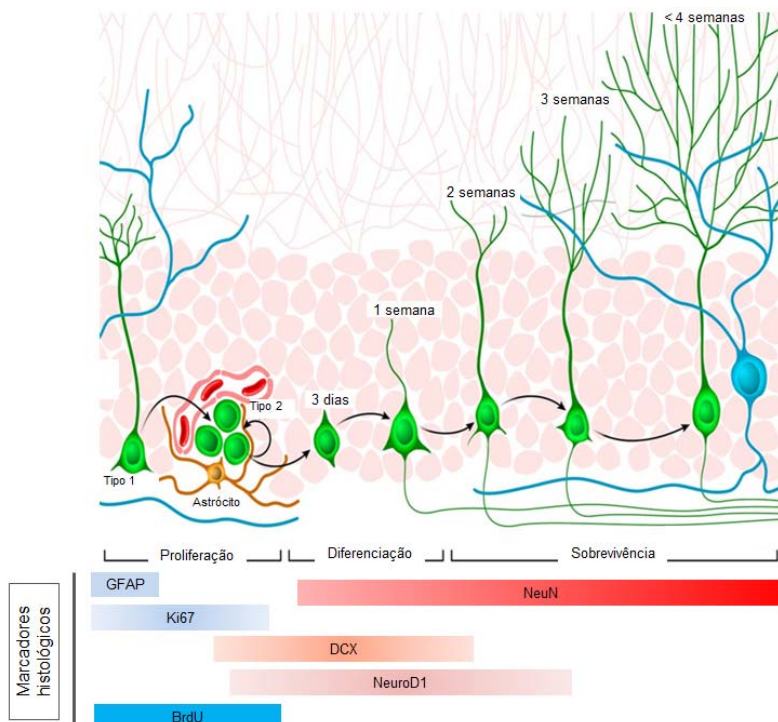
Acreditava-se que a neurogênese só acontecesse durante o processo de desenvolvimento embrionário e que depois disso, o sistema nervoso fosse imutável, constituindo assim, o Dogma da Neurobiologia. Trabalhos que utilizavam autorradiação (ALTMAN, 1960; KAPLAN & HINDS, 1977) apontavam para a neurogênese em adultos, mas não foram o suficiente para “quebrar” esse Dogma fortemente instaurado (SILVA, 2009).

Até que a partir de 1989, os avanços nos estudos sobre a neurogênese foram possíveis pelo desenvolvimento de técnicas imunoistoquímicas. Nessa técnica, são utilizados anticorpos acoplados a moléculas fluorescentes contra uma proteína ou uma molécula de interesse, chamados de marcadores histológicos, pois essas proteínas ou moléculas ficam “marcadas” possibilitando sua visualização em microscopia. A análise da proliferação celular é possível após marcar células que incorporaram um análogo da timina, BrdU (5'-bromo-2'-

desoxiuridina), no DNA durante a fase “S” do ciclo celular. É possível também utilizar juntamente com o BrdU, proteínas marcadoras de neurônios (por exemplo, Neu-N) ou de células gliais (por exemplo, GFAP - Proteína ácida fibrilar glial), para posterior visualização em microscópio confocal. Isso garante uma boa identificação do fenótipo das células (AIMONE et al., 2014; CAMERON & MCKAY, 2001; KEMPERMANN et al., 1998).

No cérebro humano adulto, foram identificadas células-tronco neurais em regiões específicas: na zona subgranular do giro denteado do hipocampo (do inglês - SGZ, *subgranular zone* e DG, *dentate gyrus*) e na zona subventricular (do inglês – SVZ, *subventricular zone*) dos ventrículos laterais. Nestas regiões, as células-tronco neurais dão origem a células progenitoras neurais tipo 1, também conhecidas como células radiais, que dão origem às células tipo 2 ou células não-radiais. São as células progenitoras neurais do tipo 2 que estão comprometidas com a origem de neurônios ou células da glia (Figura 1). As células progenitoras neurais da SVZ migram até o Bulbo Olfatório para suplementar essa região com novos neurônios ou células gliais (AIMONE et al., 2014; CAMERON et al., 1993; ERIKSSON et al., 1998; GONÇALVES et al., 2016; SILVA, 2009; VAAN PRAG et al., 2002; ZHAO et al., 2008).

Figura 1: Esquema demonstrando as etapas da neurogênese.



Células-tronco proliferam e dão origem às células tipo 1, que por sua vez, originam células do tipo 2. As células do tipo 2 iniciam o processo de diferenciação que darão origem aos neurônios, completando o processo de neurogênese. Em cada etapa são sintetizadas proteínas que podem ser usadas como marcadores histológicos ou o marcador pode ser uma molécula exógena (BrdU) (Adaptado de AIMONE et al., 2014).

Em humanos durante a idade adulta, são adicionados aproximadamente 700 novos neurônios por dia em cada hipocampo, correspondendo a uma renovação anual de 1,75%

dos neurônios (SPALDING et al., 2013). A neurogênese no hipocampo é de particular importância porque é a área crítica do cérebro envolvida com a aprendizagem, memória e humor (JESSBERGER et al., 2009; KEMPERMANN et al., 1998; KUHN et al., 1996; RAO et al., 2006). Este efeito foi demonstrado em estudos usando lentivírus para bloquear neurogênese no DG do hipocampo, o que resultou em prejuízo na cognição e decréscimo na memória espacial, quando avaliado em testes como o Labirinto aquático de Morris e no Teste de reconhecimento de novo objeto em ratos adultos (JESSBERGER et al., 2009).

A neurogênese por si só, pode não resultar em aumento de cognição, mas já foi demonstrado que o aumento da neurogênese é suficiente para reduzir comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo em animais submetidos a um modelo de estresse com tratamento crônico de corticosterona (HILL et al., 2015).

Por outro lado, a alteração no processo da neurogênese, causando um crescimento anormal na quantidade de novas células, pode contribuir para doenças, como a epilepsia do lobo temporal. Esta é a forma mais comum de epilepsia em adultos, onde há um aumento da excitabilidade neuronal no DG, o que causa aumento das convulsões e resulta também em migração, morfologia e conectividades anômalas em neurônios recém-nascidos (PARENT et al., 1997, 2008).

A diminuição da neurogênese e da área hipocampal é observada em doenças neurodegenerativas, como na doença de

Parkinson, Alzheimer, doença de Huntington e doenças psiquiátricas, como na depressão, transtorno bipolar, estresse, ansiedade e esquizofrenia (BOUCKAERT et al., 2016; CHENG et al., 2016; ELVSÅSHAGEN et al., 2016; MURATA et al., 2017; SCHOENFELD & CAMERON, 2015; SINGH et al., 2016).

Dentre as doenças psiquiátricas, a depressão é uma doença crônica, heterogênea e incapacitante (KRISHNAN & NESTLER, 2011), que acomete 121 milhões de pessoas no mundo (OMS, 2015). Diversos fármacos antidepressivos que inibem a recaptação da serotonina (Fluoxetina, por exemplo), tem como efeito o aumento da neurogênese; (PETRIK et al., 2012; DENG & GAGE, 2015). E em pacientes com Depressão Maior o prejuízo na neurogênese pode ser devido à queda dos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês Brain-derived neurotrophic factor) examinados no soro sanguíneo (ERICKSON Et al., 2012; MOICA et al., 2016).

Nas doenças degenerativas, alguns estudos sugerem que a neurogênese alterada no hipocampo adulto representa um evento crítico no início da doença de Alzheimer e que a neurogênese disfuncional resultante da doença precoce pode exacerbar a vulnerabilidade neuronal à doença de Alzheimer e contribuir para o comprometimento da memória (MU & GAGE, 2011). E prejuízos na memória de pacientes com a doença de Parkinson estão associados à atrofia hipocampal (YILDIZ et al., 2015).

A diminuição na neurogênese não é observada só em condições patológicas, mas também em condições fisiológicas.

No envelhecimento, declínios nas taxas de proliferação e diferenciação das células progenitoras neurais do hipocampo também são observados (KEMPERMANN et al., 1998; KUHN et al., 1996; RAO et al., 2006; SAHAY A. & HEN R., 2007).

A SVZ e a SGZ do DG representam nichos neurogênicos ou microambientes que permitem e apoiam a neurogênese. Experimentos *in vitro* em co-culturas e manipulação da neurogênese *in vivo*, permitiu identificar componentes-chave e fatores que compõem o nicho neurogênico. Dentre eles: a micróglia, que atua na liberação de interleucinas e contato célula-célula; os astrócitos, que liberam fatores de crescimento e neurotrofinas; e a proximidade com a vascularização, que representa uma abundante origem de fatores extrínsecos que podem modular a neurogênese (AIMONE et al., 2014; ZHAO et al. 2008).

1.1.1 Fatores que modulam a neurogênese

A neurogênese é um processo que pode ser modulado por diversos mecanismos fisiológicos e/ou patológicos. Alguns estímulos externos podem modular positiva ou negativamente a neurogênese (ROLF & SUN, 2015).

O exercício físico (corrida, por exemplo), aprendizado, enriquecimento ambiental, são tidos como estimulantes da neurogênese. Enquanto que a privação de sono, ingestão crônica de álcool e drogas, estresse e envelhecimento são fortes inibidores (ERIKSSON et al., 1998; KANDRATAVICIUS et al.,

2007; MA et al., 2017). O exercício físico e o estresse foram os primeiros fatores identificados e são conhecidos como os mais potentes moduladores da neurogênese (AIMONE et al., 2014).

Na neurogênese induzida pelo exercício físico em camundongos, a liberação de serotonina (5-HT) possui um papel importante, pois quando subunidades do receptor 5-HT₃ são deficientes, foi observada uma redução de neurogênese e do efeito tipo-antidepressivo induzidos pelo exercício físico (KONDO et al., 2015).

Estudos que utilizam ambientes enriquecidos cognitiva e fisicamente por 4 semanas, promovem neurogênese no DG e na SVZ. Este efeito é decorrente do aumento de neurotrofinas e fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular endothelial growth factor*) e BDNF no hipocampo de murinos (CAO et al., 2004; WANG et al., 2015).

Fatores de crescimento e fatores neurotróficos promovem crescimento, aumento na quantidade de espinhas e ramificações dendríticas e aceleram a maturação neuronal (GONÇALVES et al., 2016). A administração intraventricular por 3 dias dos fatores de crescimento: Fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2, do inglês *Fibroblast growth factor 2*) e HB-EGF (do inglês, *heparin binding epidermal growth factor-like growth factor*) aumenta a neurogênese em camundongos jovens e idosos (JIN et al., 2003).

Animais estressados liberam maior quantidade de glicocorticoides na corrente sanguínea que agem negativamente

sobre a neurogênese (AIMONE et al., 2014; FITZSIMONS et al., 2016). E acredita-se que múltiplos fatores moleculares conhecidos por contribuir para a patogênese da doença de Alzheimer, principalmente Apoliproteína E, preselinina 1, proteína β -amiloide e seus metabólitos, também podem modular negativamente a neurogênese hipocampal (MU & GAGE, 2011).

Durante o processo de envelhecimento, a quantidade de astrócitos não diminui no hipocampo, porém há um declínio na síntese e liberação de fatores pró-neurogênicos. Esse perfil alterado dos astrócitos no hipocampo de ratos idosos, sugere que os astrócitos são um dos maiores responsáveis pela manutenção de um nicho neurogênico e o declínio na secreção de fatores pró-neurogênicos se correlaciona com o declínio da neurogênese hipocampal decorrente do envelhecimento (AIMONE et al., 2014).

A neurogênese é fortemente controlada por vários fatores de transcrição e moléculas de sinalização endógena, incluindo Notch, TGF- β , e Wnts (SINGH et al., 2016). Já foi demonstrado que a ativação da via de sinalização da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), promove aumento da proliferação de células-tronco neurais e da neurogênese em camundongos idosos (ROMINE et al., 2015). Além disso, o tratamento com MK-801, um antagonista do receptor glutamatérgico ativado por N-metil-D-aspartato (NMDA) induz neurogênese em animais jovens e idosos, atenua a ansiedade e fenótipos tipo-depressivo através da ativação da via de sinalização de Wnt/ β -catenina no hipocampo de ratos

hemiparkinsonianos (SINGH et al., 2016; PÉREZ-DOMPER et al., 2016), sugerindo uma regulação glutamatérgica negativa para neurogênese (SINGH et al., 2016).

Desta forma, a neurogênese pode ser modulada através de meios endógenos e exógenos e dentre esses fatores este estudo irá abordar o papel do nucleosídeo endógeno guanosina, o qual demonstra exercer efeitos tróficos e mitóticos sobre células neurais *in vitro* e *in vivo* (RATHBONE et al., 1999). Portanto, este nucleosídeo apresenta um grande potencial para ser investigado em estudos relacionados à neurogênese.

1.2 Guanosina

A guanosina (GUO) é um nucleosídeo purinérgico endógeno derivado da guanina com importantes efeitos neuroprotetores e neurotróficos descritos em vários estudos (LANZMASTER et al., 2016; RATHBONE et al., 1999; RIBEIRO et al., 2015; SCHMIDT et al., 2007). No meio extracelular, a GUO pode ser proveniente da defosforilação do 5'-monofosfato de guanosina (GMP) através da atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase ou pode ser liberada das células por transportadores de nucleosídeos (LANZMASTER et al., 2016; SCHMIDT et al., 2007, SOARES, 2005, OLESKOVICZ et al., 2008; TRAVERSA et al., 2002).

Apesar de haver muitos estudos avaliando os efeitos da GUO, seus mecanismos de ação não estão completamente elucidados. Diversos estudos apontam que alguns efeitos da

GUO são mediados por interação com receptores acoplados às proteínas-G e sinalização intracelular por 5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e 5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e/ou através de interação com receptores adenosinérgicos. Estudos também sugerem que a GUO possui sítios de ligação específicos, porém não foi identificada uma proteína receptora específica para a GUO (FRIZZO et al., 2001; OLESKOVICZ et al., 2008; TRAVERSA et al., 2002).

A GUO também modula vias de sinalização celular, como a da fosfatidilinositol-3 cinase/Akt (PI3K/Akt) e vias de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) como p38^{MAPK} e ERK1/2. (DAL-CIM et al., 2011,2012, 2013, ; DI IORIO et al., 2004; GIULIANI et al., 2012; PETTIFER et al., 2007,;RATHBONE et al., 1991, 1998, 2008; SOUZA 2005; TRAVERSA et al., 2002).

1.2.1 Efeito neuroprotetor da guanosina

A GUO tem demonstrado um importante efeito neuroprotetor atuando sobre o sistema glutamatérgico, diminuindo o dano celular decorrente da super-estimulação glutamatérgica e ainda prevenindo alterações comportamentais.

Dentre os efeitos neuroprotetores observados *in vitro*, a GUO em condições normais e após dano hipóxico/hipoglicêmico, promoveu um significativo aumento na captação de glutamato em cultura de astrócitos (FRIZZO et al., 2003) e em fatias cerebrais de ratos, diminuindo os níveis extracelulares de glutamato (DAL-CIM et al., 2013; FRIZZO et al., 2002).

Em estudos *in vivo*, foi observado que após um dano isquêmico em ratos, ocorre um aumento significativo na liberação de GUO extracelular, começando 2 horas após o insulto e persistindo durante 7 dias (UEMURA et al., 1991). E durante e após um dano isquêmico em murinos, astrócitos liberam 3 vezes mais purinas derivadas da guanina do que as derivadas da adenina (CICCARELLI et al., 1999; RATHBONE et al., 1998, 1999, 2008).

Em fatias de hipocampo submetidas à privação de oxigênio e glicose, um modelo *in vitro* de isquemia cerebral, foi observado que a GUO reduz a liberação de aminoácidos excitatórios, estimula a atividade da glutamina sintetase e diminui o dano celular por modular a atividade de transportadores de glutamato (DAL-CIM et al., 2016).

Em cultura de astrócitos, a GUO protege contra a apoptose induzida por estaurosporina (DI IORIO et al., 2004). Esse efeito anti-apoptótico foi demonstrado também em cultura de células de neuroblastoma SH-SY5Y, em que a GUO reverteu a citotoxicidade e apoptose induzida por 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP+) (PETTIFER et al., 2007), pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (GIULIANI et al., 2012) e pelo peptídeo beta-amiloide (DI IORIO et al., 2004; PETTIFER et al., 2004, 2007).

Em modelos animais, a administração intraventricular ou oral de GUO em camundongos previne convulsões induzidas por ácido quinolínico (agonista endógeno do receptor NMDA) e convulsões e morte induzidas por α -dendrotoxina (bloqueador

endógeno de canais de potássio), (LARA et al., 2001; SCHMIDT et al., 2005; VINADÉ et al., 2003).

Em modelos animais da doença de Parkinson, com o tratamento da GUO foi observada a diminuição de apoptose neuronal e aumento de neurônios dopaminérgicos, acompanhados de redução da bradicinesia (SU et al., 2009). Em modelo animal de doença de Parkinson utilizando-se reserpina, viu-se que há uma diminuição de GUO estriatal em 41% em relação ao controle (LOEFFLER et al., 1998), o que pode relacionar a diminuição de GUO no Sistema Nervoso Central com a morte neuronal.

Em enfermidades psiquiátricas, tais como: ansiedade, esquizofrenia e depressão, a GUO demonstra atividades promissoras. Em um modelo animal de esquizofrenia, a administração de GUO reverteu o aumento da atividade locomotora induzida por MK-801 (TORT et al., 2004).

O tratamento com GUO em camundongos apresentou efeito tipo- ansiolítico, comparado com o fármaco Diazepam (VINADÉ et al., 2003). Também foi observado que a GUO exerce um efeito tipo-antidepressivo que envolve as vias de sinalização da PI3K e da mTOR (BETTIO 2012, BETTIO et al., 2014). Este efeito pode estar relacionado, em parte, a sua capacidade de modular defesas antioxidantes, prevenindo o desequilíbrio oxidativo no hipocampo em animais submetidos a protocolos indutores de estresse (BETTIO et al., 2014).

No entanto, quando testada em um paradigma comportamental de avaliação de memória aversiva, a esquiva

inibitória, a GUO apresentou efeitos amnésicos, assim como antagonistas de receptores de glutamato (cetamina, por exemplo) em ratos e camundongos (ROESLER et al., 2000; VINADÉ et al., 2003, 2004).

1.2.2 Efeito neurotrófico da guanosina

Alguns estudos sugerem que a GUO e derivados da guanina possam ser liberados no meio extracelular após um dano e exerçam além de efeitos neuroprotetores, efeitos neurotróficos. Estes efeitos neurotróficos colaboram com a hipótese de um possível efeito da GUO sobre a neurogênese, sendo que possíveis efeitos do tratamento *in vivo* da GUO na modulação da proliferação e diferenciação celular, dependem da sua ação extracelular nas células neurais promovendo sinalização e ativação de fatores tróficos como o NGF e BDNF (LANZMASTER et al., 2016).

A adição de GUO e nucleotídeos derivados da guanina em cultura de células com meio sem adição de soro aumenta a proliferação de: astrócitos, fibroblastos, células endoteliais, células microgliais em cocultura com astrócitos (CICCARELLI et al., 2000; RATHBONE et al., 1991, 1992, 1998) e neurônios. Há evidências de que a proliferação neuronal estimulada pela GUO é dependente da via AMPc-CREB (SU et al., 2013).

Evidências obtidas em cultura de células neurais demonstraram que GUO e GMP ocasionam efeitos tróficos em astrócitos cerebelares, alterando a organização de proteínas da

matriz extracelular, laminina e fibronectina (DECKER et al., 2007), o que favorece a adesão neuronal sobre astrócitos, em um protocolo de co-cultura.

Em cultura de astrócitos, a GUO atua aumentando síntese e liberação de fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês *Nerve Growth Factor*) (MIDDLEMISS et al., 1995). E em células PC12, a GUO sozinha ou em sinergismo com NGF, foi capaz de aumentar a neuritogênese (BAU et al., 2005; GYSBERS & RATHBONE, 1996; MIDDLEMISS et al., 1995), induzindo a expressão de Heme Oxigenase-1 e aumentando os níveis de GMPc intracelular (BAU et al., 2005).

O tratamento com a GUO em um modelo de dano da espinha dorsal induziu regeneração nervosa. Este efeito foi decorrente do aumento do número de células progenitoras oligodendrogliais com oligodendrócitos maduros presentes na área danificada, o que permitiu a remielinização axonal, aumentando a recuperação funcional, como funções sensoriais e motoras (JIANG et al., 2003, 2008). Estas melhorias foram associadas à redução da resposta inflamatória à lesão, à redução da morte celular apoptótica e à preservação de axônios e da mielina (JIANG et al., 2007).

Alguns trabalhos sugerem que o tratamento com GUO estimula a proliferação de células-tronco neurais na SVZ, além de induzir aumento da síntese do FGF-2 (SU et al., 2009). O tratamento crônico com a GUO também aumenta significativamente o número de neurônios imaturos na região do DG ventral do hipocampo (BETTIO et al., 2016).

Em resumo, estes estudos sugerem que a guanosina extracelular (GUO) no Sistema Nervoso Central atua estimulando a proliferação, a síntese de fatores tróficos e a diferenciação celular. Com base em todas as evidências de ação da guanosina, este estudo pretende avaliar o possível efeito neurogênico e tipo-antidepressivo da GUO e sua influência em testes comportamentais que avaliam a memória em roedores.

2 JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem hoje no mundo, 841 milhões de pessoas idosas (com mais de 60 anos) e a projeção para 2050 é de que essa população atinja 2 bilhões de pessoas, o que vai representar 22% da população mundial.

A maioria dos problemas de saúde enfrentados por pessoas mais velhas são associados a condições crônicas (OMS, 2015). O envelhecimento da população leva a uma maior percentagem de doenças, particularmente aquelas que afetam funções cognitivas, como as doenças neurodegenerativas. As doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer têm como um dos sintomas decorrentes a Depressão maior. Antidepressivos usuais, como a fluoxetina, possuem como efeito a indução de neurogênese.

A capacidade das células-tronco neurais de se auto-renovar, proliferar e diferenciar em todos os tipos de células do sistema nervoso torna a compreensão e os fatores que regulam

esse processo uma potencial terapia para doenças neurodegenerativas (AIMONE et al., 2014).

Como os neurônios gerados por adultos de ambas as regiões cerebrais têm papéis funcionais, aproveitar esta população endógena de células-tronco para repovoar o cérebro danificado, induzindo a neurogênese após perda neuronal, seja por danos agudos, tais como: isquemia, trauma craniano; por doenças neurodegenerativas e psiquiátricas ou mesmo como consequência do envelhecimento, se mostra uma boa estratégia para reverter os danos causados, buscando propiciar qualidade de vida (ROLFE & SUN, 2015).

Neste contexto, a investigação do possível efeito neurogênico e tipo-antidepressivo da GUO é importante e abre portas para futuras terapias para doenças neurodegenerativas e psiquiátricas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar se a administração crônica da guanosina altera comportamento de camundongos e apresenta efeito neurogênico no Hipocampo e na Zona Subventricular.

3.2 Específicos

3.2.1 Avaliar se a administração de guanosina altera parâmetros comportamentais (emocionais e cognitivos) utilizando-se testes comportamentais que avaliam memória espacial e aprendizado de camundongos;

3.2.2 Avaliar se a administração com guanosina possui efeito tipo-antidepressivo através de um teste preditivo clássico;

3.2.3 Identificar o fenótipo e alterações na proliferação e diferenciação das células neuroprogenitoras através de análises imunoistoquímicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

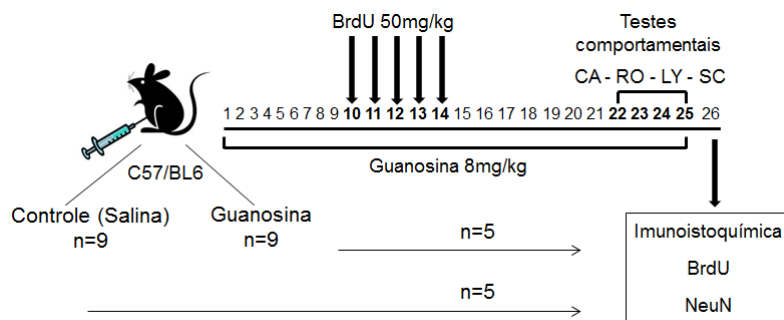
4.1 Animais

Foram utilizados 18 camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 2 meses de idade no início do experimento e mantidos em ciclo 12h claro/escuro com acesso a água e alimento a vontade (*ad libitum*). Os animais foram uma doação do Prof. Dr Rui Daniel Schröder Prediger da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Os experimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da CEUA da Universidade Federal de Santa Catarina, protocolo PP00955.

Os animais foram divididos em 2 grupos: 9 como grupo Controle (receberam apenas Salina) e 9 como grupo Guanosina. Destes foram escolhidos randomicamente 5 de cada grupo para realização da imunoistoquímica.

4.2 Desenho experimental

Figura 2: Esquema com desenho experimental geral.



Desenho experimental do tratamento com Guanosina (8mg/Kg, i.p., injeções diárias), BrdU (5 injeções de 50mg/Kg, i.p.) e testes comportamentais: CA (campo aberto), RO (realocação de objeto), LY (labirinto em Y), SC (suspensão pela cauda).

4.3 Administração de guanosina

A administração da GUO se deu pela via intraperitoneal (8 mg/Kg em 0,9 % salina, i.p.), sendo esta dose escolhida pelos seus efeitos neuroprotetores previamente reportados (SU et al., 2009). Os animais receberam esta dose uma vez ao dia por 25 dias consecutivos.

4.4 Administração de bromodeoxiuridina

Para marcar a proliferação de células neurais progenitoras, foi administrado BrdU conforme estudos anteriores (DENG E GAGE 2015, GEBARA et al., 2015). Foram administradas injeções intraperitoneais (50mg/kg em 0,9%

salina), uma vez por dia durante 5 dias consecutivos a partir do 10º dia de tratamento com GUO, como ilustrado na Figura 2.

4.5 Avaliação comportamental

Todos os testes foram realizados em um ambiente iluminado com luz vermelha e isolado acusticamente. Os animais foram habituados ao ambiente 1 h antes de cada teste e os aparatos utilizados foram limpos com álcool 10 % a cada troca de animal, a fim de eliminar odores (CRUZ et al., 2012).

4.5.1 Campo aberto

Com o propósito de excluir possíveis alterações locomotoras foi realizado o teste do campo aberto. O animal foi alocado em uma arena quadrada de madeira medindo 40x60x50 cm, cercada por paredes de forma que o animal não pudesse fugir, com o assoalho marcado com 12 quadrados, o que permite a quantificação da atividade locomotora do animal. Individualmente os animais foram colocados na arena por 30 minutos, o comportamento foi registrado utilizando-se uma câmera de vídeo e os dados foram posteriormente analisados com o auxílio do programa ANY-maze®. O parâmetro avaliado neste teste foi a distância percorrida por cada animal (CRUZ et al., 2012).

4.5.2 Realocação de objetos

A realocação de objetos (RO) é um teste que envolve memória e aprendizado. Os animais foram postos individualmente em uma câmara de acrílico de pequeno porte: 25 cm × 25 cm × 40 cm com 2 objetos iguais lado a lado. O animal ficou livre para exploração por 5 min e retirado da câmara. Após 90 min o animal foi reintroduzido à câmara, mas desta vez, um dos objetos foi realocado e o animal ficou livre para explorar por 5 min (Figura 5 A). A tendência é que o animal com a memória preservada, explore mais o objeto que foi retirado do lugar, pois roedores por comportamento natural possuem uma preferência pelo novo (MARTINS 2012; OLMO et al., 2009).

4.5.3 Labirinto em Y

O labirinto em Y é um teste que avalia a capacidade de memória espacial de roedores. O teste consiste em colocar o animal em um aparato possuindo 3 braços em forma de Y, sendo-lhe permitido caminhar livremente pelos três braços por 8 min. Quando colocados no aparato, camundongos geralmente exploram o mínimo possível o braço que acabaram de visitar. Alternâncias bem sucedidas consistem em visitar os três braços diferentes (denominados a, b, e c) consecutivamente (abc, bca, cab, etc.). A análise foi realizada através da contagem do número de alternâncias espontâneas do animal em uma única sessão de teste. A porcentagem de alternância foi calculada pelo número

total de acertos dividido pelo número total de entradas em qualquer braço – 2 x100 (DELLU et al., 1992).

4.5.4 Teste de suspensão pela cauda

Este teste é preditivo para avaliarmos um efeito tipo-antidepressivo de substâncias ou fármacos e se baseia no fato de que os animais quando estão diante de uma situação inescapável, assumem uma postura de imobilidade após tentativas sucessivas de escape. A tendência é que o animal diante desse estímulo de estresse ou com comportamento do tipo-depressivo desista mais rapidamente de escapar, ficando mais tempo imóvel e esse tempo é reduzido com fármacos com efeito antidepressivo (CRYAN et al., 2005; RIPOLI et al., 2003). O teste foi idealizado por Steru e colegas (1985) e consiste em suspender o animal pela cauda com fita adesiva à aproximadamente 50 cm do chão. O tempo de imobilidade do animal é avaliado durante um período de 6 minutos.

4.6 Imunoistoquímica

Os camundongos foram perfundidos com Paraformaldeído 4%, o cérebro foi retirado e colocado na solução de Paraformaldeído 4% por 24h a 4°C. Logo após, os cérebros foram colocados em uma solução de 30% sacarose a 4°C para crioproteção. A partir do cérebro fixado, fatias cerebrais com 40 µm foram obtidas após o corte no criostato (LEICA CM 1850). Uma em cada 5 fatias (séries 1-5) foram coletadas e lavadas em

Tampão fosfato com Tween 20 0,1% (PBS-T), bloqueadas com 5% BSA/PBS-T por 3h e incubadas com anticorpos primários, anti-NeuN (diluição 1:500, anticorpo obtido de camundongo; Millipore), anti-BrdU (diluição 1:350, anticorpo obtido de rato; Acurate) de um dia para o outro a 4°C, sob agitação constante. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS-T (quatro lavagens de 10 min cada) e incubadas com anticorpos secundários apropriados (anti-rato 647-; anti-camundongo 488-diluição 1:500, anticorpos obtidos de macaco, LifeTech) por 2 horas. Após lavagem com tampão Tris/SDS com Tween 20 0,1% (10 min), as fatias foram incubadas com Hoechst (diluição 1:2000) durante 10 min e em seguida, lavadas duas vezes com PBS. As fatias foram transferidas para lâminas e as lamínulas foram colocadas utilizando Vectashield® (Vector Laboratories, Inc.) como meio de montagem.

As fatias foram visualizadas no microscópio confocal de fluorescência do LCME/UFSC, com objetiva de 20x e 60x para confirmação da localização de marcadores celulares. As imagens foram obtidas por câmera acoplada ao microscópio com sistema de captura.

Para quantificação das células positivas para BrdU e NeuN, as células marcadas foram contadas em cada fatia, independentemente do tamanho ou morfologia da célula. As células positivas para NeuN foram contadas e expressas como porcentagem das células co-localizadas com as células marcadas por BrdU.

4.7 Análises estatísticas

Os resultados comportamentais obtidos foram analisados usando ANY-maze software e submetidos ao test-t de Student's. Os resultados histológicos foram submetidos ao teste de Mann-Witney. Foram considerados significativos valores com $p < 0,05$.

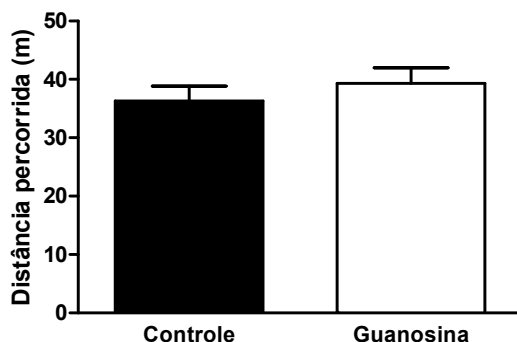
5. RESULTADOS

5.1 Testes comportamentais

A GUO foi administrada na dose de 8mg/kg, i.p., por 25 dias consecutivos em camundongos C57BL/6. Os animais foram pesados diariamente e não foi observada diferença de peso entre os grupos, sendo as médias 24,20g para o grupo GUO e 25,36g para o grupo Controle.

O teste de campo aberto foi realizado para descartar alterações locomotoras decorrentes do uso da GUO. Não houve diferença entre a distância percorrida pelos animais nos dois grupos (Figura 3), demonstrando ausência de alteração na atividade locomotora induzida pela GUO. Esta observação viabiliza e justifica a realização de outros testes comportamentais.

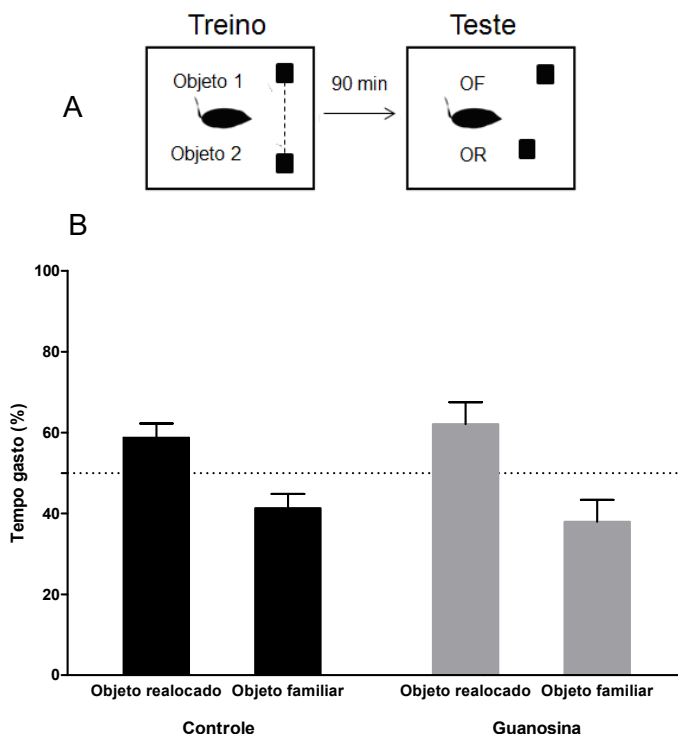
Figura 3. Efeito do tratamento com Guanosina no teste de Campo Aberto.



Os camundongos foram tratados com salina (controle) ou guanosina (8mg/kg, i.p.) por 25 dias e submetidos ao teste do campo aberto no 22º dia de tratamento. Distância percorrida pelos animais em metros durante 30 min. Resultados avaliados por teste t de Student's. (n=7-8 animais/grupo).

A realocação de objetos (RO) é um teste que envolve memória e aprendizado e espera-se que o animal com memória preservada possua preferência em explorar o objeto realocado (MARTINS 2012). Nesse teste, o animal foi colocado na arena com os objetos dispostos lado a lado (treino) e na sua reintrodução um dos objetos foi realocado (teste) (Figura 4A). No treino os dois grupos exploraram igualmente ambos os objetos (objeto 1 e 2). E durante o teste, não houve preferência pelo objeto realocado entre os grupos (Figura 4B), demonstrando não haver efeito do tratamento com a GUO sobre a memória.

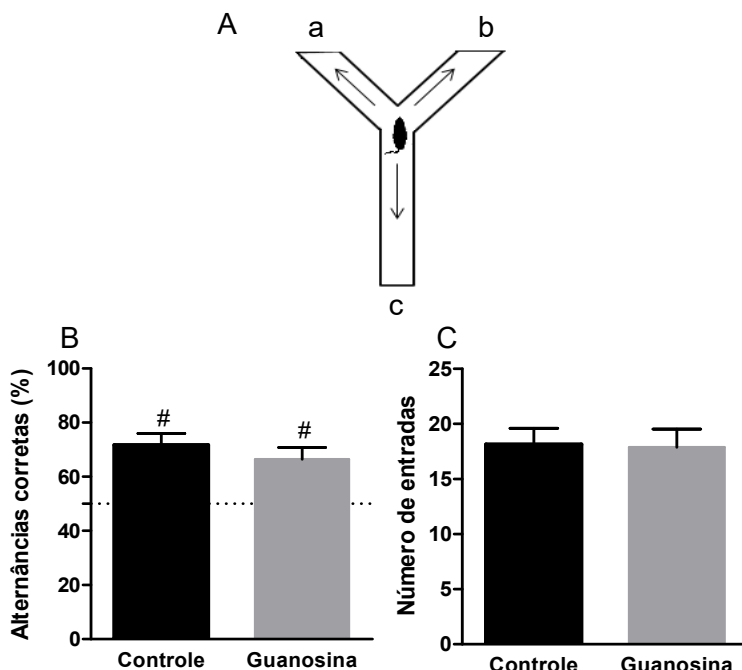
Figura 4: Efeito do tratamento com guanossina no teste de Realocação de Objetos.



Os camundongos foram tratados com salina (controle) ou guanossina (8 mg/kg, i.p.) por 25 dias e submetidos ao teste de realocação de objeto no 23º dia. Esquema demonstrando teste de realocação de objetos (A) que em treino os objetos estão alinhados e no teste há o deslocamento de um dos objetos. Tempo total gasto de exploração em porcentagem pelos grupos Controle e Guanossina no objeto familiar (OF) e no objeto realocado (OR) durante o teste (B). Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=7-9), $p < 0,05$; # diferente do valor teórico de 50%, quando comparado Controle vs Guanossina avaliados por teste t Student's.

O teste do labirinto em Y avalia a capacidade de memória espacial de roedores (DELLU et al., 1992). Neste teste o animal foi posicionado no aparato e deixado livre para entrar em quaisquer dos braços (Figura 5A) por 8 minutos. Não foi observada diferença no percentual de alternâncias corretas realizadas pelos grupos (Figura 5B), assim como não houve diferença no número de entradas nos braços (Figura 5C), demonstrando que o tratamento com GUO não altera a memória espacial dos roedores.

Figura 5. Demonstração do desempenho de camundongos após tratamento com guanossina no teste do labirinto em Y.



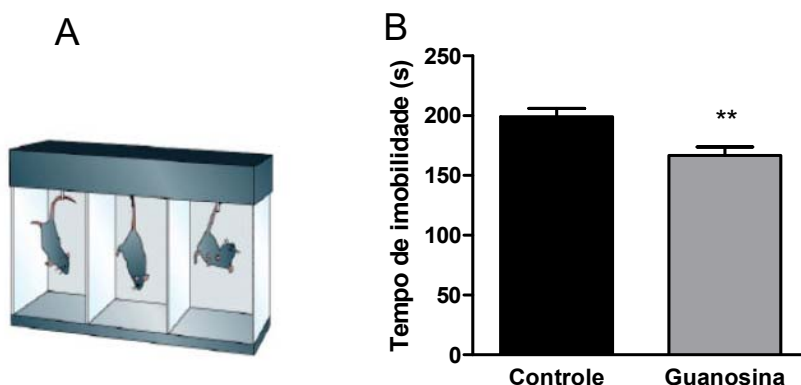
Os camundongos foram tratados com salina (controle) ou guanossina (8 mg/kg, i.p.) por 25 dias e submetidos ao teste do labirinto em Y no 24º dia. A – Esquema mostrando teste do Labirinto em Y. B - Comparação de alternâncias espontâneas em porcentagem dadas pela equação: [total de acertos (entrada em três braços diferentes consecutivos) / número total de entradas em qualquer braço -2 x100]. C – Número de entradas nos braços. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=7-8), # $p < 0,05$ quando comparado Controle vs Guanossina por teste t Student's.

O teste de suspensão pela cauda é classicamente utilizado como teste preditivo para avaliar efeito tipo-antidepressivo de fármacos (CRYAN et al., 2005). Neste

paradigma, fármacos com efeito tipo-antidepressivo diminuem o tempo de imobilidade dos animais.

Animais tratados com GUO demonstraram uma diminuição no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda quando comparado ao grupo Controle (Figura 6B) evidenciando o efeito tipo-antidepressivo da GUO.

Figura 6. Efeito do tratamento com guanosina na redução do tempo de imobilidade observado no teste de Suspensão pela Cauda.



Os camundongos foram tratados com salina (Controle) ou guanosina (8 mg/kg, i.p.) por 25 dias e submetidos ao teste de suspensão pela cauda no 25º dia. Esquema demonstrando teste de Suspensão pela cauda (A) em que a GUO reduziu o tempo de imobilidade nesse teste (B). Resultados avaliados por teste t de Student's, ** $p < 0,01$ comparado ao controle (Esquema adaptado de CRYAN, J.F. & HOLMES, A.).

5.2 Efeito do tratamento com a guanosina na neurogênese

A proliferação e a neurogênese foram avaliadas através do tratamento com BrdU e técnicas imunoistoquímicas, em que fatias cerebrais contendo a Zona Subventricular (Figura 7A) e o Giro Denteado (Figura 7B) foram coradas.

Figura 7: Esquema demonstrando as áreas cerebrais neurogênicas em corte coronal.

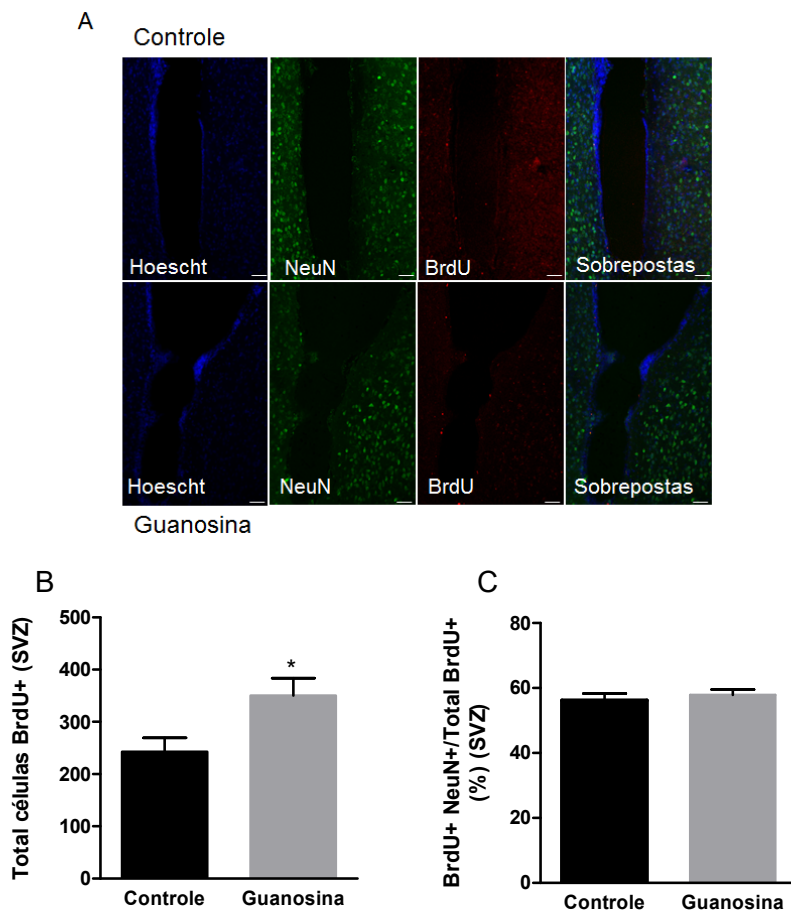


Foram avaliados o efeito da GUO sobre a neurogênese através de ensaios imunoistoquímicos as duas áreas em destaque com o retângulo azul, a Zona Subventricular – A e o Giro denteado – B do hipocampo.

Nas imunomarcações, a marcação com HOESCHT cora núcleo celular em azul, a proteína Neu-N, presente em neurônios maduros foi corada com a cor verde e a marcação com BrdU foi realizada com a cor vermelha (Figura 8A e 9A).

Na SVZ houve aumento de células positivas para BrdU (BrdU+), indicando aumento de proliferação proporcionado pelo tratamento com a GUO (Figura 8B), mas não houve aumento na quantidade de células duplamente marcadas BrdU+/NeuN+, demonstrando que a GUO não teve efeito sobre a diferenciação neuronal nesta região (Figura 8C).

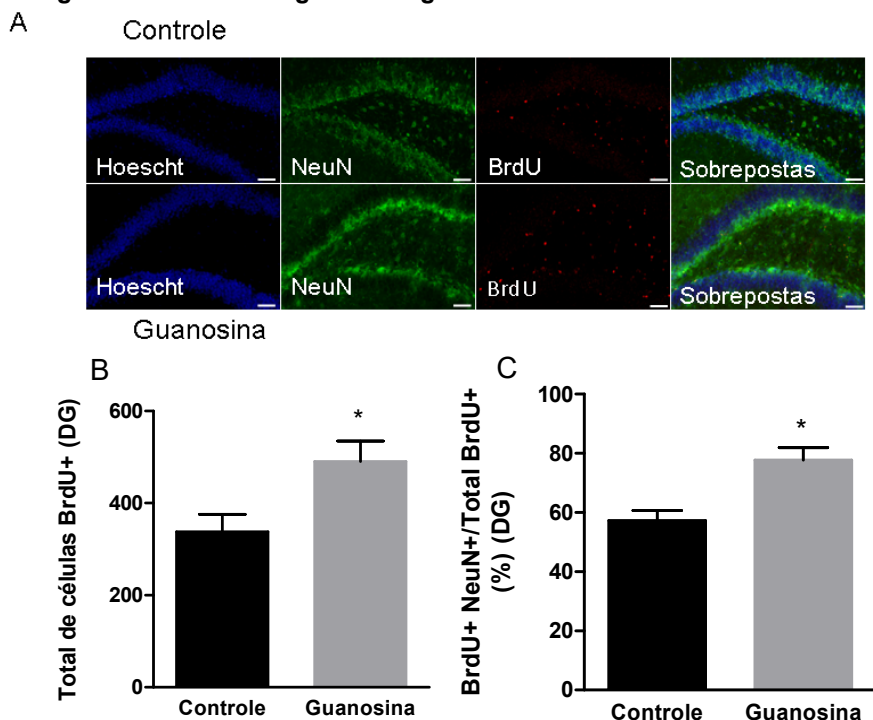
Figura 8. Efeito neurogênico da guanosina na Zona Subventricular.



A SVZ marcada imunoistoquimicamente (A), escala de 50 μ m. Aumento de células marcadas com BrdU após tratamento com guanosina (B). Comparação de células duplamente marcadas (BrdU+/NeuN+) em porcentagem (C). Para quantificação de células BrdU+ e/ou NeuN+ foram contadas manualmente células sem distinção de forma e tamanho, a cada fatia em série de 1-5 coletadas ao longo do cérebro. Dados representam a média \pm SEM., $n=4$ /grupo, $*p<0.05$, teste de Mann-Wittney.

No DG foi observado aumento de células BrdU+, indicando aumento de proliferação proporcionado pelo tratamento com GUO (Figura 9B) e aumento na quantidade de células duplamente marcadas BrdU+/NeuN+, sugerindo o efeito neurogênico da GUO nessa região (Figura 9C).

Figura 9. Efeito neurogênico da guanosina no Giro Denteado.



O DG marcado imunohistoquimicamente (A). Aumento de células marcadas com BrdU após tratamento com guanosina (B) escala de 50 μ m. Demonstração do aumento de células duplamente marcadas (BrdU+/NeuN+) em porcentagem (C) após tratamento com guanosina. Células BrdU+ e/ou NeuN+ foram contadas manualmente sem distinção de forma e tamanho, a cada fatia em série de 1-5 coletadas ao longo do cérebro. Dados representam a média \pm E.P.M., n=4/grupo, *p<0.05, teste de Mann-Wittney.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração crônica de GUO na dose de 8mg/kg por 25 dias via i.p. em camundongos da linhagem C57BL/6 induziu proliferação celular na SVZ e no DG, além de aumento da quantidade de neurônios no DG sugerindo efeito neurogênico nessa região. Também demonstrou efeito tipo-antidepressivo sem alterar o desempenho dos animais em testes que avaliam a memória e o aprendizado.

Nos testes comportamentais que avaliam memória e aprendizado, como nos testes de Realocação de objetos e Labirinto em Y, não foi identificado qualquer prejuízo da memória decorrente do uso da GUO. Em contraste, Vinadé e colaboradores (2003, 2004) identificaram efeitos amnésicos causados pela GUO, após 15 dias de administração de GUO 0,5 mg/ml *ad libitum*. Porém o teste efetuado por eles foi de memória aversiva e neste tipo de teste, a área límbica é mais acionada pelo animal do que em testes de memória e aprendizado em que o hipocampo é mais acionado (ESPERIDIÃO-ANTÔNIO et al., 2007). Nenhum outro estudo identificou um efeito amnésico da GUO.

Já foi evidenciado o efeito ansiolítico da GUO (ALMEIDA et al., 2016) e nesse trabalho avaliamos o efeito tipo-antidepressivo induzido pela GUO. Ficou então demonstrado que a administração crônica da GUO via i.p. possui efeito tipo-antidepressivo, pois reduziu o tempo de imobilidade do animal no teste preditivo de suspensão pela cauda. O que corrobora com o encontrado por Bettio (2012), em que foi verificado o efeito tipo-

antidepressivo da GUO, nos testes clássicos preditivos de suspensão pela cauda e nado forçado, após administração oral aguda da GUO em diversas concentrações (0,05-5 mg/kg, p.o.).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram o efeito neurotrófico da GUO sobre diversos tipos celulares, incluindo células neurais, além do efeito na diferenciação dessas células (BETTIO et al., 2016; CICARELLI et al., 2000; DECKER et al., 2007; JIANG et al., 2003,2007, 2008; RATHBONE et al., 1991, 1992, 1998; SU et al., 2009).

Esse trabalho demonstrou efeito proliferativo da GUO no DG, o que não foi encontrado por Bettio e colaboradores (2016). Os dois trabalhos utilizaram animais que não foram submetidos previamente a nenhuma manipulação farmacológica ou gênica (*naïve*) e tempos de administração da GUO parecidos (25 e 21 dias, respectivamente). Porém, distintas doses (8mg/kg e 5mg/kg, respectivamente) e diferentes linhagens de camundongos (C57/BL6 e Swiss, respectivamente) foram utilizadas. A linhagem C57/BL6, utilizada neste trabalho, já foi demonstrada ser mais suscetível à proliferação e à diferenciação neuronal, quando comparado com outras linhagens (KEMPERMANN et al.,1997; COELHO 2014), podendo ser essa uma das causas da diferença encontrada.

A GUO foi capaz de aumentar imunomarcação com NeuN, o que também foi verificado por Bettio e colegas (2016) o aumento de imunomarcação, porém com NeuD, demonstrando um possível aumento do número de neurônios no DG, sugerindo a modulação da GUO no processo da neurogênese.

Além do DG, esse trabalho avaliou a proliferação e a diferenciação de células progenitoras neurais na SVZ. Células que proliferam na SVZ migram para o bulbo olfatório. Murinos têm como característica um bulbo olfatório extraordinariamente maior em tamanho e importância para a vida desse animal que humanos (MOURA & XAVIER, 2011; RASLAN 2011). Su e colegas (2009) encontraram tanto aumento da proliferação, quanto na diferenciação de células neuroprogenitoras, originando novos neurônios na SVZ. No entanto, neste estudo, observamos indução de proliferação, mas não de diferenciação de células neuroprogenitoras dando origem a neurônios.

Em nosso trabalho, as células que proliferaram podem ter se diferenciado em outros tipos celulares, ao invés de neurônios. Esta possibilidade deve ser esclarecida em futuros estudos, utilizando-se marcações para identificar, por exemplo, astrócitos (GFAP, do inglês *glial fibrillary acid protein*) ou outras marcações para células gliais.

Os modelos animais utilizados também podem explicar as diferenças encontradas. Esse trabalho utilizou animais *naive*, enquanto no trabalho de Su e colegas (2009) foram utilizados modelos animais com indução farmacológica para a doença de Parkinson. Nesta doença, além da morte de neurônios dopaminérgicos, Braak e colaboradores (2003) consideram que o primeiro estágio da enfermidade, dentre outros sintomas, é a alteração no núcleo olfativo anterior, levando à hiposmia/anosmia. A prevalência da disfunção olfativa nos pacientes parkinsonianos varia de 70 a 90 % dos casos (Rosso

et al., 2008), sendo possível que a diferenciação celular observada por Su e colaboradores, seja devida ao prejuízo na migração celular, acarretando diferenciação no local onde as células foram originadas. Ou seja, no presente estudo, é possível que tenha ocorrido aumento neuronal, porém a diferenciação não foi observada, uma vez que as células progenitoras neurais da SVZ migram para o bulbo olfatório para se diferenciar em neurônios, terminando assim o processo da neurogênese. Portanto, estudos futuros analisando também o bulbo olfatório devem ser considerados, para uma análise mais completa do efeito da GUO na SVZ.

Como o hipocampo é uma área responsável pela memória e aprendizado e nesse trabalho houve aumento de células NeuN+, sugerindo um aumento da neurogênese e esse aumento poderia refletir em um acréscimo na capacidade de memória e aprendizado dos animais. Estudos realizados em ratos transgênicos que tinham por característica aumento de neurogênese (HILL et al., 2015; SAHAY et al. 2011), demonstraram que esse aumento não alterou memória e aprendizado em diversos testes que avaliam esses processos cognitivos, assim como observado no presente estudo. É possível concluir que o aumento de neurogênese em murinos saudáveis não altera processos cognitivos como memória e aprendizagem (HILL et al., 2015; SAHAY et al. 2011).

Nesse trabalho, a GUO demonstrou um efeito tipo-antidepressivo em animais *naïve*. Inúmeros trabalhos demonstram que sintomas da depressão estão ligados à

diminuição da neurogênese no hipocampo (BOUCKAERT et al., 2016; CHENG et al., 2016; MURATA et al., 2017; SCHOENFELD & CAMERON, 2015; SINGH et al., 2016); que diversos antidepressivos que inibem a recaptação da serotonina tem como efeito o aumento da neurogênese; e que a remissão dos sintomas coincidem com a neurogênese estabelecida no hipocampo (de 3 a 4 semanas), dando base a hipótese neurotrófica da depressão (Santarelli et al., 2003; Petrik et al., 2012; DENG & GAGE, 2015).

Santarelli e colegas (2003) após realizarem tratamento com o antidepressivo fluoxetina em camundongos, relacionaram o aumento de neurônios imaturos e maduros vistos em seu trabalho com efeito tipo-antidepressivo. Nesse estudo encontramos aumento de neurônios maduros no hipocampo e efeito tipo-antidepressivo promovidos pelo tratamento com GUO. No entanto, ainda há controvérsias e alguns estudos não conseguiram relacionar a neurogênese hipocampal com a melhora no comportamento tipo-depressivo em testes que avaliam a ansiedade e a depressão (DENG & GAGE, 2015).

Os efeitos neuroprotetores da GUO no cérebro, já largamente relatados na literatura, podem também contribuir para o efeito tipo-antidepressivo da GUO. Bettio e colaboradores (2012) demonstraram que a administração aguda via oral de GUO em doses diversas (0,05-5 mg/kg, p.o.) possui um efeito tipo-antidepressivo demonstrados em dois testes preditivos: o nado forçado e a suspensão pela cauda, com a realização dos testes 60 min após a administração. Isso sugere que a GUO

induz efeito tipo-antidepressivo independente da neurogênese, uma vez que para haver neurogênese um tempo maior é necessário para divisão e diferenciação celular (AIMONE et al., 2014). Não devemos descartar a possibilidade de que o efeito tipo-antidepressivo observado nesse trabalho pode ser independente do efeito neurogênico, uma vez que não realizamos experimentos que comprovem a relação causa-efeito.

O mecanismo envolvido no aumento da neurogênese pela GUO ainda não está esclarecido, mas sabe-se que a ativação de vias de sinalização como a ativação da via mTOR pela administração de GUO demonstrou possuir efeito tipo-antidepressivo (BETTIO 2012). Essa via pode ser ativada por neurotrofinas e fatores de crescimento (MATSUOKA & YASHIRO, 2014) e estudos sugerem que a GUO pode modular a síntese e a liberação dessas moléculas (MIDDLEMIS et al., 1995; SU et al., 2009). Estudos demonstram que a GUO ativa PI3K/AKT que pode ativar mTOR (DAL-CIM et al., 2011; MATSUOKA & YASHIRO, 2014; PETTIFER et al., 2007). Sendo possível que essa via também possa estar envolvida nos efeitos da GUO observados nesse estudo. Futuros experimentos utilizando inibidores e antagonistas dessa via podem ajudar a elucidar estas perguntas.

Dessa forma, esse estudo contribuiu para demonstrar que a GUO possui efeito proliferativo na SVZ e no DG, induz diferenciação neuronal no DG de camundongos adultos sem causar prejuízo sobre a memória e aprendizado, além de possuir efeito tipo-antidepressivo.

7 CONCLUSÃO

O tratamento crônico com GUO na dose de 8mg/kg, i.p., por 25 dias consecutivos em camundongos C57BL/6:

- 1- Induz proliferação celular no giro dentado do hipocampo e na zona subventricular;
- 2- Induz diferenciação celular no giro dentado do hipocampo;
- 3- Possui efeito tipo-antidepressivo quando avaliado no teste de suspensão pela cauda;
- 4- Não altera a memória e o aprendizado de camundongos nos testes de Realocação de objetos e Labirinto em Y.

PERSPECTIVAS

Em trabalhos futuros será investigado se o efeito neurogênico da guanosina é devido ao aumento da síntese e liberação de fatores neurotróficos e fatores de crescimento, como: FGF-2, NGF, BDNF, através de PCR em tempo real com amostras de homogenatos cerebrais de camundongos tratados com guanosina.

Será também avaliado se a neurogênese constatada nesse estudo é dependente da ativação de vias de sinalização ativadas pela guanosina.

REFERÊNCIAS

- AIMONE, J.B.; LI, Y.; LEE, S.W.; CLEMENSON, G.D.; DENG, W. AND FRED H. GAGE. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. **Physiol.**, v.94, p.991–1026, 2014.
- ALMEIDA, R.F.; COMASSETO, D.D.; RAMOS, D.B.; HANSEL, G.; ZIMMER, E.R.; LOUREIRO S.O.; GANZELLA, M.; SOUZA, D.O. Guanosine anxiolytic-like effect involves adenosinergic and glutamatergic neurotransmitter systems. **Mol Neurobiol.** v.54, e.1, p.423-436, 2017.
- ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **Journal of Comparative Neurology**, v128, p.431–474, 1966.
- BAU, C.; MIDDLEMISS, P.J.; HINDLEY, S.; JIANG, S.; CICCARELLI, R.; CACIAGLI, F.; DIORIO, P.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Guanosine stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of heme oxygenase and cyclic GMP. **Purinergic Signalling**, v.1, p.161–172, 2005.
- BETTIO, L.E.B. **Envolvimento dos receptores NMDA e da via L-arginina óxido nítrico no efeito tipo-antidepressivo da guanosina.** 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- BETTIO, L.E.B.; NEIS, V.B., PAZINI, F.L.; BROCARD, P.S.; PATTEN, A.R.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B.R.; RODRIGUES, A.L. The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation. **Eur J Neurosci**, 43, p. 1006-15, 2016.
- BETTIO, L.E.B.; FREITAS, A.E.; NEIS, V.B.; SANTOS, D.B.; RIBEIRO, C.M.; ROSA, P.B.; FARINA, M.; RODRIGUES, A.L.

Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v.127, p.7–14, 2014.

BOUCKAERT, F.; DOLS, A.; Emsell, L.; DE WINTER, F.L.; VANSTEELANDT, K.; CLAES, L.; SUNAERT, S.; STEK, M.; SIENAERT, P.; VANDENBULCKE, M. Relationship between hippocampal volume, serum BDNF and depression severity following electroconvulsive therapy in late-life depression. **Neuropsychopharmacology**, v.41, e.11, p.2741-8, 2016.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RÜB, U.; DE VOS, R.A.; STEUR E.N.J.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, v.24, e.2, p.197-211, 2003

CAO, L.; JIAO, X.; ZUZGA, D.S.; LIU, Y.; FONG, D.M.; YOUNG, D.; DURING, M.J. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. **Nat Genet**, v.36, p.827–835, 2004.

CAMERON, H.A. & MCKAY, R.D. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. **The Journal of comparative neurology**, v.435, p.406-17, 2001.

CAMERON, H.A.; WOOLLEY, C.S.; MCEWEN, B.S.; GOULD, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience**, v.56, p.337-44, 1993.

CHENG, Y.; CAWLEY, N.X.; YANIK, T.; MURTHY, S.R.K.; LIU, C.; KASIKCI, F.; ABEBE, D.; LOH, Y.P. A human carboxypeptidase E/NF- α 1 gene mutation in an Alzheimer's disease patient leads to dementia and depression in mice. **Transl Psychiatry**, v.6, e.973, p.1-12, 2016.

CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; GIULIANI, P.; D'ALIMONTE, I., BALLERINI, P., CACIAGLI, F., RATHBONE, M.P. Rat Cultured Astrocytes Release Guanine-Based Purines in Basal Conditions and After Hypoxia/Hypoglycemia. **Glia**, v.25, p.93–98, 1999.

CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; D'ALIMONTE, I.; GIULIANI, P.; FLORIO, T.; CACIAGLI, F.; MIDDLEMISS, P.J.; RATHBONE, M.P. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and raised by the co-presence of microglia. **Glia**, v.29, e.3, p.202-211, 2000.

COELHO, L.S. **Estudo da neurogênese hipocampal no modelo da sensibilização locomotora induzida por morfina**. 76 f. Dissertação (Mestrado) Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2014.

CRYAN, J.F. & HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nature**, v.4, p.775-790, 2005.

CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral**, v.29, p.571–625, 2005.

CRUZ, A.P.M. & FERNANDEZ, J. L. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. 2012. In: LANDEIRA-FERNANDES, J.; FUKUSIMA, S. **Métodos em neurociências**. São Paulo: Manole, 2012. Cap 13.

DAL-CIM T.; MARTINS W.C.; SANTOS A.R.; TASCA C.I. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neuroscience**, v.183, p.212-220, 2011.

DAL-CIM, T.; MOLZ, S.; EGEA, J.; PARADA, E.; ROMERO, A.; BUDNI, J.; SAAVEDRA, M.M.; BARRIO, L.; TASCA, C.I.; LÓPEZ, M.G. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. **Neurochemistry International**, v.61, p.397–404, 2012.

DAL-CIM, T.; LUDKA, F.K.; MARTINS, W.C.; REGINATO, C.; PARADA, E. J.; EGEA, J.; LOPES, M.G.; TASCA, C.I. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **Neurochem.**, v.126, p.437–450, 2013.

DAL-CIM, T.; MARTINS, W.C.; THOMAZ, D.T.; COELHO, V.; POLUCENO, G.G.; LANZMASTER, D.; VANDRESEN-FILHO, S.; TASCA, C.I. 2016. Neuroprotection Promoted by Guanosine Depends on Glutamine Synthetase and Glutamate Transporters Activity in Hippocampal Slices Subjected to Oxygen/Glucose Deprivation. **Neurotox Res.**, v.29, p.460–468, 2016.

DECKER, H.; FRANCISCO, S.S.; MENDES-DE-AGUIAR, C.B.; ROMÃO, L.F.; BOECK C.R.; TRENTIN, A.G.; MOURA-NETO, V.; TASCA, C.I. Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. **J Neurosci Res.**, v.85, p.1943-1951, 2007.

DENG, W; GAGE, F.H. The effect of immature adult-born dentate granule cells on hyponeophagial behavior is related to their roles in learning and memory. **Front Syst Neurosci.**, v.9, p.9-34, 2015.

DI IORIO, P.; BALLERINI, P.; TRAVERSA, U.; NICOLETTI, F.; D'ALIMONTE, I.; KLEYWEGT, S.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P.; CACIAGLI, F.; CICARELLI, R. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. **Glia**, v.46, e.4, p.356-368, 2004.

DELLU, F.; CONTARINO, A.; SIMON, H.; KOOB, G.F.; GOLD, L.H. Genetic Differences in Response to Novelty and Spatial Memory Using a Two-Trial Recognition Task in Mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.73, p.31–48, 2000.

ELVSÅSHAGEN, T.; ZUZARTE, P.; WESTLYE, L. T.; ERLEND BØEN, E.; JOSEFSEN, D.; BIRGITTE BOYE, B.; HOL, P.K.; MALT, U.F.; YOUNG, L.T.; ANDREAZZA, A.C. Dentate gyrus-cornu ammonis (CA) 4 volume is decreased and associated with depressive episodes and lipid peroxidation in

bipolar II disorder: Longitudinal and cross-sectional analyses. **Bipolar Disorders**, v.18, p.657–668, 2016.

ERICKSON, K.I.; MILLER, D.L.; ROECKLEIN, K.A. The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF. **Neuroscientist**, v.18, e.1, p.82-97. 2012.

ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; ERIKSSON, T.B.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H.; Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v.4, p.1313 – 1317, 1998.

FITZSIMONS, C.P.; HERBERT, J.; SCHOUTEN, M.; MEIJER, O.C.; LUCASSEN, P.J.; LIGHTMAN, S. Circadian and ultradian glucocorticoid rhythmicity: Implications for the effects of glucocorticoids on neural stem cells and adult hippocampal neurogenesis. **Front Neuroendocrinol**, v.4, p.44-58, 2016

ESPERIDIÃO-ANTONIO, V.; MAJESKI-COLOMBO, M.; TOLEDO-MONTEVERDE, D.; MORAES-MARTINS, G.; FERNANDES, J. J.; ASSIS, M. B.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Neurobiologia das emoções. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.35, e. 2, p. 55-65, 2008.

FRIZZO, M.E.; LARA, D.R.; DAHM, K.C.; PROKOPIUK, A.S.; RAYMOND, A.; SWANSON, R.A.; SOUZA, D.O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. **Neuro Report**, v.12, e.4, p.879-81, 2001.

FRIZZO, M.E.; LARA, D.R.; PROKOPIUK, A.S.; VARGAS, C.R.; SALBEGO, C.G.; WAJNER, M.; SOUZA, D.O. Guanosine Enhances Glutamate Uptake in Brain Cortical Slices at Normal and Excitotoxic Conditions. **Cell Mol Neurobiol.**, v.22, e.3, p.353-63, 2002.

FRIZZO, M.E.; SOARES, F.A.; DALL'ONDER, L.P.; LARA, D.R.; SWANSON, R.A.; SOUZA, D.O. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. **Brain Research**, v.972, p.84–89, 2003.

GEBARA, E.; UDRY, F.; SULTAN, S.; TONI, N. Taurine increases hippocampal neurogenesis in aging mice. **Stem Cell Research**, v.14, p.369-379, 2015.

GIULIANI, P.; ROMANO, S.; BALLERINI, P.; CICCARELLI, R.; PETRAGNANI, N.; CICHITTI S.; ZUCCARINI, M.; JIANG, S.; RATHBONE, M.P.; CACIAGLI, F.; DI IORIO, P. Protective activity of guanosine in an in vitro model of Parkinson's disease. **Panminerva Med.**, v.54, p.43-51, 2012.

GONÇALVES, J.T.; SCHAFER, S.T.; GAGE, F.H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. **Cell**, v.167, p.897-914, 2016.

GYSBERS, J.W.; RATHBONE, M.P. Neurite outgrowth in PC12 cells is enhanced by guanosine through both cAMP-dependent and -independent mechanisms **Neuroscience Letters**, v.220, p.175-178, 1996.

HILL, A.S.; SAHAY, A.; HEN, R. Increasing adult hippocampal neurogenesis insufficient to reduce anxiety and depression-like behaviors. **Neuropsychopharmacology**, v.40, p.2368–2378, 2015.

JESSBERGER, S.; CLARK, R.E.; BROADBENT, N.J.; CLEMENSON JR., G.D; CONSIGLIO, A.; LIE, D.C. et al. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairsspatial and object recognition memory in adult rats. **Learn. Mem.**, v.16, p.147–154, 2009.

JIANG, S.; BENDJELLOUL, F.; BALLERINI, P.; D'ALIMONTE, I.; NARGI, E.; JIANG, C.; HUANG, X.; RATHBONE, M.P. Guanosine reduces apoptosis and inflammation associated with restoration of function in rats with acute spinal cord injury **Purinergic Signalling** v 3 p 411–421, 2007

JIANG, S.; KHAN, M.I.; LU, Y.; WANG, J.; BUTTIGIEG, J.; WERSTIUK, E.S. Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. **Neuroreport**, v.14, p.2463-2467, 2003.

JIANG, S.; BALLERINI, P.; BUCCELLA, S.; GIULIANI, P.; JIANG, C.; HUANG, X. Remyelination after chronic spinal cord injury is associated with proliferation of endogenous adult progenitor cells after systemic administration of guanosine. **Purinergic Signal**, v.4, p.61-71, 2008.

JIN, K.; SUN, Y.; XIE, L.; BATTEUR, S.; MAO, X.O.; SMELICK, C.; LOGVINOVA, A.; GREENBERG, D.A. Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus na subventricular zone of aged mice. **Aging Cell**, v.2, p.175-183, 2003.

KANDRATAVICIUS, L.; MONTEIRO, M. R.; ROMCY-PEREIRA, R. N.; ARISI, G. M.; CAIRASCO N. G.; LEITE, J. P. Neurogênese no cérebro adulto e na condição epiléptica. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v.13, p.3, 2007.

KAPLAN, M. S. & HINDS, J. W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. **Science**, v.197, p.1092–1094, 1977

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. **Neurobiology**, v.94, p.10409-10414, 1997.

KEMPERMANN, G.; BRANDON, E.P.; GAGE, F.H. Environmental stimulation of 129/SsJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Curr. Biol.**, v.8, p.939-942, 1998.

KONDO, M.; NAKAMURA, Y.; ISHIDA, Y.; SHIMADA, S. The 5-HT3 receptor is essentialfor exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects. **Mol. Psychiatry**, v.20, p.1428–1437, 2015.

KRISHNAN, V. & NESTLER, E.J. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. **Am J Psychiatry**, v.167, e.11, p.1305-1320, 2010.

KUHN, H.G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related

decrease of neuronal progenitor proliferation. **J Neurosci**, v.16, p.2027-2033, 1996.

LANZMASTER, D.; DAL-CIM, T.; PIERMARTIRI, T.; TASCA, C.I. Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. **Aging and disease**, v.7, e.5, p.657-679, 2016

LOEFFLER, D.A.; LEWITT, P.A.; JUNEAU, P.L.; CAMP, D.M.; DEMAGGIO, A.J.; MILBURY, P.; MATSON, W.R.; RATHBONE, M.P. Altered guanosine and guanine concentrations in rabbit striatum following increased dopamine turnover. **Brain Res Bull.**, v.45, e.3, p.297-9, 1998.

LUDKA F.K. **Avaliação da associação entre o efeito neuroprotetor e antidepressivo da atorvastatina em camundongos**. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MA, C.L., MA, X.T.; WANG, J.J.; LIU, H.; CHEN, Y.F.; YANG, Y. Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. **Behavioural Brain Research**, v.317, p.332–339, 2017.

MARTINS, W. C. **Estudo do Efeito da Atorvastatina sobre Alterações Comportamentais e Bioquímicas em Camundongos Infundidos com o Peptídeo β -amilóide (A β 1-40)**. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MATSUOKA, T. & YASHIRO, M. The Role of PI3K/Akt/mTOR Signaling in Gastric Carcinoma. **Cancers**, v.6, e.3, p.1441-1463, 2014.

MIDDLEMISS, P.; GYSBERS, J.W.; RATHBONE, M.P. Extracellular guanosine and guanosine-5'-triphosphate increase: NGF synthesis and release from cultured mouse neopallial astrocytes. **Brain Research**, v.677, p.152-156, 1995.

MOICA, T.; GRECU, I. G.; MOICA, S.; GRECU, M.G.; BUICU, G. E. Cortisol and Hippocampal Volume as Predictors of Active

Suicidal Behavior in Major Depressive Disorder: Case Report. **Trakya University Faculty of Medicine Balkan Med J**, v.33, p.706-9, 2016.

MOURA, P. J. & XAVIER, G.F. Memória de reconhecimento social em ratos. **Psicologia USP**, v.21, e.2, p.355-389, 2010.

MURATA,Y.; NARISAWAA, Y.; SHIMONOA, R.; OHMORIA,H.; MORIA, M.

OHEA, K.; MINEB, K.; ENJOJI, M. A high fat diet-induced decrease in hippocampal newly-born neurons of male mice is exacerbated by mild psychological stress using a Communication Box. **Journal of Affective Disorders**, v.209, p.209–216, 2017.

MU, Y.; GAGE, F.H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. **Mol. Neurodegener.** p.6 -85, 2011.

Organização Mundial da Saúde. Resumo Relatório mundial de envelhecimento e saúde. 2015.

OLESKOVICZ, S.P.B.; MARTINS, W.C.; LEAL, R.B.; TASCA, C.I. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation. **Neurochemistry International**, v.52, p.411–418, 2008.

OLMO, N.; GRAMAGE, E.; ALGUACIL, L.F.; PÉREZ-PINERA, P.; DEUEL, T.D.; HERRADO´ N, G. Pleiotrophin inhibits hippocampal long-term potentiation: A role of pleiotrophin in learning and memory. **Growth Factors**, v.27, e.3, p.189–194, 2009.

PARENT, J.M.; MURPHY, G.G. Mechanisms and functional significance of aberrant seizure-induced hippocampal neurogenesis. **Epilepsia**, v.49,e.5, p.19-25, 2008.

PARENT, J.M.; YU, T.W.; LEIBOWITZ, R.T.; GESCHWIND, D.H.; SLOVITER, R.S.; LOWENSTEIN, D.H. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus.**J Neurosci.**, v.17, e.10, p.3727-38, 1997.

PÉREZ-DOMPER, P.; PALOMO, V.; GRADARI, S.; GIL, C.; CEBALLOS, M.L.; MARTÍNEZ, A.; TREJO, J.L. The GSK-3-inhibitor VP2.51 produces antidepressant effects associated with adult hippocampal neurogenesis. **Neuropharmacology**, v.116, p.174-187, 2017.

PETRIK, D.; LAGACE, D.C.; EISCH, A.J. The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? **Neuropharmacology**, v.62, p. 21-34, 2012

PETTIFER, K.M.; JIANG, S.; BAU, C.J.; BALLERINI, P.; D'ALIMONTE, I.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.R. MPP+-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine Kathleen M. **Purinergic Signalling.**, v.3, p.399-409, 2007.

PETTIFER, K.M.; KLEYWEGT, S.; BAU, C.J.; RAMSBOTTOM, J.D.; VERTES, E.; CICCARELLI, R.; CACIAGLI, R.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Guanosine protects SH-SY5Y cells against beta-amiloid-induced apoptosis. **Neuroreport**, v.15, p.833-36, 2004.

RAO, M.S.; HATTIANGADY, B.; SHETTY, A.K. The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus. **Aging Cell**, v.6, p.545-58, 2006.

RASLAN, A.C.S. **Participação do sistema colinérgico em comportamentos socialmente motivados.** Dissertação (Mestrado) - Curso de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; DELUCA, B.; JOVETICH, M. Extracellular guanosine increases astrocyte cAMP: inhibition by adenosine A2 antagonists. **Neuroreport.**, v.2, e.11, p.661- 4, 1991.

RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; GYSBERS, J.W.; DEFORGE, S.; COSTELLO, P.; DEL MAESTRO, R.F. Purine

nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of wide range of cell types. **In vitro cell dev Biol.**, v.28, p.529-36, 1992.

RATHBONE, M. P.; MIDDLEMISS, P.J.; ANDREW C.; CACIAGLI F.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; HUANG, R. The trophic effects of Purines and purinergic signaling in pathologic reactions of astrocytes. **Alzheimer disease and Associated disorders**, v.12, p.S36-S45, 1998.

RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; GYSBERS, J.W.; ANDREW, A.; HERMAN, A.R.; REED, J.K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; FRANCESCO CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 663-690, 1999.

RATHBONE, M.; PILUTTI, L.; CACIAGLI, F.; JIANG, S. Neurotrophic effects of extracellular guanosine. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v.27, e.6, p.666-72, 2008.

RIBEIRO, F.F.; XAPELLI, S; MIRANDA-LOURENÇO, C.; TANQUEIRO, S.; FONSECA-GOMES, J.; DIÓGENES, M.; RIBEIRO, J.; SEBASTIÃO, A. Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. **Neuropharmacology**, v.104, p.226-42, 2016.

RIPOLL, N.; DAVID, D.J.P.; DAILLY, E.; HASCOËT, M.; BOURIN, M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. **Behavioural Brain Research**, v.143, p.193–200, 2003.

ROESLER, R.; VIANNA, M.R.M.; LARA, D.R., IZQUIERDO, I., SCHMIDT, A.P., SOUZA, D.O. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. **Neuroreport**. v.11, p2537-2540, 2000.

ROLF, A.; SUN, D. **Stem Cell Therapy in Brain Trauma: Implications for Repair and Regeneration of Injured Brain in Experimental TBI Models**. In: Kobeissy, F.H. editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Chapter 42. **Frontiers in Neuroengineering**, 2015.

ROMINE J., GAO X., XU X.M., SO K. F., CHEN J. The proliferation of amplifying neural progenitor cells is impaired in the aging brain and restored by the mTOR pathway activation. **Neurobiology of Aging**, v.36, p.1716-1726, 2014.

ROSSO, A.L.Z.; NICARETTA, D.H.; DE MATTOS, J.P. Correlações Anatomoclínicas na Doença de Parkinson. **Revista Brasileira de Neurologia**, v.44, p.41-47, 2008.

SAHAY, A.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nat.Neurosci.** v.10, p.1110–1115, 2007.

SAHAY, A; SCOBIE, K.N.; HILL, A.S.; O'CARROLL, C.M.; KHEIRBEK, M.A.; BURGHARDT, N.S.; FENTON, A.A.; DRANOVSKY, A.; HEN, R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. **Nature**, v.472, e7344, p.466–470, 2011.

SANTARELLI, L., SAXE, M., GROSS, C., SURGET, A., BATTAGLIA, F., DULAWA, S., WEISSTAUB, N., LEE, J., DUMAN, R., ARANCIO, O., BELZUNG, C. & HEN, R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v.301, p.805–809, 2003.

SCHMIDT, A.; ÁVILA, T.T.; SOUZA, D.O.; Intracerebroventricular Guanine-Based Purines Protect Against Seizures Induced by Quinolinic Acid in Mice. **Neurochemical Research**, v.30, p.69–73, 2005.

SCHMIDT, A.P.; LARA, D.R.; SOUZA, D.O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian nervous system. **Pharmacol. Ther.**, v. 116, p. 401-416, 2007.

SCHOENFELD, T. J.; CAMERON, H. A. Adult neurogenesis and mental illness. **Neuropsychopharmacology** v.40, p.113–28, 2015

SILVA I. S. Neurogênese no sistema nervoso adulto de mamíferos. **Revista da biologia**, v.3, 2005.

SINGH, S.; MISHRA, A.; SRIVASTAVA, N.; SHUKLA, S. MK-801 (Dizocilpine) Regulates Multiple Steps of Adult Hippocampal Neurogenesis and Alters Psychological Symptoms via Wnt/ β -Catenin Signaling in Parkinsonian Rats. **Chem. Neurosci.**, 2016.

SPALDING, K.L.; BERGMANN, O.; ALKASS, K.; BERNARD, S.; SALEHPOUR, M.; HUTTNER, H.B.; BOSTRÖM, E.; WESTERLUND, I.; VIAL, C.; BUCHHOLZ, B.A.; POSSNERT, G.; MASH, D.C.; DRUID, H.; FRISÉN, J. Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. **Cell**, v.153, p.1219-1227, 2013.

SOARES, F.A.A. **Guanosina: uma nova abordagem do sistema purinérgico**. Tese (Doutorado). Curso de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P.; The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, p. 367-70, 1985.

SU, C.; ELFEKI, N.; BALLERINI, P.; D'ALIMONTE, I.; BAU, C.; CICCARELLI, R.; CACIAGLI, F.; GABRIELE, J.; JIANG, S. Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism. **J. Neurosci Res.**, v.3, p.617-25, 2009.

TRAVERSA, U.; BOMBI, G.; DI IORI, P.; CICCARELLI, R.; WERSTIUK, E.S.; RATHBONE, M.P. Specific [^3H] – guanosine binding sites in rat brain membranes. **Br. J. Pharmacol.** v.135, p.969-976, 2002.

TORT, A.B.; MANTESE, C.E.; ANJOS, G.M.; DIETRICH, M.O.; DALL'IGNA, O.P.; SOUZA D.O. Guanosine selectively inhibits locomotor stimulation induced by the NMDA antagonist dizocilpine. **Behavioural brain research**, v.54, p.417-422, 2004.

UEMURA, Y., MILLER, J.M., MATSON, W.R., BEAL, M.F. Neurochemical Analysis of Focal Ischemia in Rats. **Stroke**, v.22, p.1548-1553, 1991.

VAN PRAAG, H.; SCHINDER, A.F.; CHRISTIE, B.R.; TONI, N.; PALMER, T. D.; GAGE F.H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**. v.415, p.1030-4, 2002.

VINADÉ, E.R.; IZQUIERDO, I.; LARA, D. R.; SCHMIDT, A.P.; SOUZA, D.O. Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.8, p.137–143, 2004.

VINADÉ, E.R.; SCHMIDT, A.P.; FRIZZO, M.E.S.; IZQUIERDO, I.; ELISABETSKYB, E.; SOUZA, D.O. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. **Brain Research**, v.977, p.97–102, 2003.

YILDIZ, D; ERER, S.; ZARIFOĞLU, M.; HAKYEMEZ, B.; BAKAR, M.; KARLI, N.; VARLIBAŞ, Z.N.; TUFAN, F. Impaired cognitive performance and hippocampal atrophy in Parkinson disease. **Turk J Med Sci.**, v.45, n.5, p.1173-1177, 2015.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v.132, p.645–660, 2008.